

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6: A61K 9/16, 9/50</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/07072</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. März 1995 (16.03.95)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/02806</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 25. August 1994 (25.08.94)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 43 30 958.5 9. September 1993 (09.09.93) DE P 44 16 818.7 11. Mai 1994 (11.05.94) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEITSCHIES, Werner [DE/DE]; Gneissensstrasse 63, D-10961 Berlin (DE). HELDMANN, Dieter [DE/DE]; Krefelder Strasse 3, D-10555 Berlin (DE). HAUFF, Peter [DE/DE]; Stendaler Strasse 84, D-12627 Berlin (DE). FRITZSCH, Thomas [DE/DE]; Eisenstrasse 2, D-12169 Berlin (DE). STAHL, Harald [DE/DE]; Ringsstrasse 41/42, D-12205 Berlin (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> AMI INFORMATION SERVICES P.O. BOX 405, CORTE MADERA, CA 94976-0405 (415) 927-0340 • FAX (415) 927-7250 </div>	
<p>(54) Title: ACTIVE PRINCIPLES AND GAS CONTAINING MICROPARTICLES</p> <p>(54) Bezeichnung: WIRKSTOFFE UND GAS ENTHALTENDE MIKROPARTIKEL</p> <p>(57) Abstract</p> <p>New active principle-containing microparticles are disclosed which contain besides the active principle(s) at least one gas or a gaseous phase. Also disclosed are agents containing said particles (microparticulate systems), their use for releasing active principles <i>in vivo</i> in an ultrasonically controlled manner, and processes for preparing the particles and the agents.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas oder eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten <i>in vivo</i> Wirkstoff-Freisetzung, sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäÙ dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mali
AD	Andorra	GB	Verinigtes Königreich	MW	Malawi
BS	Bahamas	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BT	Butan	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentralafrikanische Republik	KG	Kirgisien	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Verinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, diese enthaltende Mittel, deren Verwendung
zur ultraschallgesteuerten Freisetzung von Wirkstoffen
sowie Verfahren zu deren Herstellung

- 5 Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die zusätzlich zum (zu den) Wirkstoff(en) mindestens ein Gas bzw. eine gasförmige Phase enthalten, diese Partikel enthaltende Mittel (mikropartikuläre Systeme), deren Verwendung zur ultraschallgesteuerten *in vivo* Wirkstoff-Freisetzung, zur ultraschallunterstützten Zellinkorporation von
10 Wirkstoffen (Sonoporation) sowie Verfahren zur Herstellung der Partikel und Mittel.

- Mikropartikuläre Systeme zur kontrollierten Wirkstofffreigabe gibt es schon seit vielen Jahren. Eine Vielzahl an möglichen Hüllsubstanzen und Wirkstoffen läßt sich hierzu verwenden. Ebenso gibt es eine ganze Reihe unterschiedlicher Herstellungsverfahren.
15 Zusammenstellungen über die verwendeten Hüllsubstanzen und Herstellungsverfahren finden sich z.B. bei: M. Bornschein, P. Melegari, C. Bismarck, S. Keipert: Mikro- und Nanopartikeln als Arzneistoffträgersysteme unter besonderer Berücksichtigung der Herstellungsmethoden, Pharmazie 44 (1989) 585-593 und M. Chasin, R. Langer (eds.): Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New
20 York, 1990.

- Die Freisetzung von Wirkstoffen aus mikropartikulären Systemen beruht überwiegend auf Diffusions- oder Erosionsprozessen [vgl. C. Washington: Drug release from microdisperse systems: A critical review, Int. J. Pharm. 58 (1990) 1-12 und J. Heller:
25 Bioerodible Systems, in: R.S. Langer, D.L. Wice (eds.): Medical applications of controlled release Vol. 1, CRC Press, Florida, 1984, p. 69-101].

- Diese Prinzipien sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß die zeitliche Steuerbarkeit der Wirkstofffreisetzung aus mikrodispersen Systemen *in vivo* auf die Geschwindigkeit des Erosionsprozesses und/oder Diffusionsprozesses begrenzt ist und nach Applikation
30 nicht weiter beeinflußt werden kann.

- Die bislang bekannten Konzepte zur örtlichen Steuerung der Wirkstofffreisetzung *in vivo* aus mikropartikulären Systemen beruhen fast ausschließlich entweder auf unspezi-
35 fischen Anreicherungen der mikropartikulären Wirkstoffträger in bestimmten Zielorganen wie Leber und Milz oder auf Maßnahmen zur gezielten Veränderung der Organverteilung *in vivo* nach Applikation durch die Veränderung der Oberflächeneigenschaften der mikropartikulären Systeme mit Hilfe von Tensiden oder

spezifitätsvermittelnden Stoffen wie z.B. Antikörpern [vgl.: R.H. Müller: Colloidal carriers for controlled drug delivery - Modification, characterization and in vivo distribution -, Kiel, 1989; S. D. Tröster, U. Müller, J. Kreuter: Modification of the biodistribution of poly(methylmethacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants, Int. J. Pharm. 61 (1991), 85-100; S.S. Davis, L. Illum, J.G. Mcvie, E. Tomlinson (eds.): Microspheres and drug therapy, Elsevier science publishers B.V., 1984 und H. Tsuji, S. Osaka, H. Kiwada: Targeting of liposomes surface-modified with glycyrrhizin to the liver, Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 1004-1008]. Alle diese Verfahren bieten darüber hinaus jedoch keine weitere Möglichkeit den Ort der Wirkstofffreisetzung nach Applikation aktiv zu beeinflussen. Des weiteren ist es nicht möglich, das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe nach Applikation zu beeinflussen.

Erste Versuche, aktiv den Ort der Wirkstofffreisetzung zu beeinflussen, beruhen auf der Möglichkeit, vorhandene, bzw. induzierte pH- oder Temperaturdifferenzen zur Freisetzung zu benutzen [vgl.: H. Hazemoto, M. Harada, N. Kamatsubara, M. Haga, Y. Kato: PH-sensitive liposomes composed of phosphatidyl-ethanolamine and fatty acid, Chem. Pharm. Bull. 38 (1990) 748-751 und J.N. Weinstein, R.L. Magin, M.B. Garwin, D.S. Zaharko: Liposomes and local hyperthermia, Science 204 (1979) 188-191]. Diese Methoden sind jedoch mit dem Nachteil behaftet, daß sie entweder begrenzt sind auf Fälle wo die erforderlichen Temperatur- bzw. pH-Differenzen bereits vorliegen (z.B. im Tumorgewebe) oder die entsprechenden zur Freisetzung erforderlichen Parameter nur durch aufwendige, z.T. invasive Maßnahmen herbeigeführt werden müssen. Darüber hinaus ist im letzteren Fall die örtliche Auflösung gering.

Ein weiteres bekanntes Verfahren, den Ort der Wirkstofffreisetzung zu beeinflussen, besteht in der Verwendung von Mikropartikeln, die durch in den Partikeln verkapselte Ferrofluide über äußerlich angelegte Magnetfelder innerhalb bestimmter Körpersegmente anreicherbar sind [K.J. Widder, A.E. Senyei: Magnetic microspheres: A vehicle for selective targeting of drugs, Pharmac. Ther. 20 (1983) 377-395]. Die Verwendung derartiger Mikropartikel erfordert allerdings die gleichzeitige gezielte Anwendung starker, fokussierbarer Magnetfelder. Magnete, die derartige Felder erzeugen, sind jedoch in der Medizin wenig verbreitet. Desweiteren läßt sich die Geschwindigkeit der Wirkstofffreigabe auf diese Weise nicht beeinflussen.

In der U.S. Patentschrift 4,657,543 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem die Freisetzung durch Ultraschalleinwirkung auf wirkstoffhaltige Polymerblöcke hervorgerufen wird. Dieser Effekt beruht im wesentlichen auf einer verstärkten Erosion des Polymers unter Schalleinwirkung. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß es nur für ortsfeste Implantate geeignet ist. Für deutliche Effekte ist zudem die Verwendung sehr hoher Schalldrücke oder von Dauerschallsignalen notwendig, die zur Gewebeschädigung führen können.

In der WO 92/22298 werden Liposomen beschrieben, die sich durch Einstrahlung von Ultraschall, der im Bereich der Resonanzfrequenz der Mikrobäschen liegt, zerstören lassen. Dabei tritt der verkapselte Wirkstoff aus. Die Resonanzfrequenz wird mit ca. 7,5 MHz angegeben. Diagnostischer Ultraschall derart hoher Frequenz weist jedoch aufgrund der hohen Absorption durch Körpergewebe nur eine geringe Eindringtiefe (wenige Zentimeter) auf. Die beschriebenen Liposomen sind deshalb nur für die Freisetzung von Wirkstoffen in oberflächennahen Gebieten des Körpers geeignet.

Bei der Verwendung von Nukleinsäuren als Wirkstoffe werden in der Literatur zwei Systeme basierend auf viralen Vektoren bzw. nicht-virale Vektoren beschrieben. In vivo werden derzeit als virale Vektoren Retro-, Adeno- und Herpesviren (bzw. deren Rekombinanten) und als nicht-virale Vektoren Liposomen und Liganden zelloberflächenspezifischer Rezeptoren untersucht (G.Y. Wu & C. H. Wu: Delivery systems for gene therapy, Biotherapy, 3 (1991) 87-95 und F. D. Ledley: Are contemporary methods for somatic gene therapy suitable for clinical applications?, Clin Invest Med 16 (1) (1993) 78-88).

Erste Untersuchungen zur Verwendung der Gentherapie beim Menschen konzentrieren sich auf genetisch bedingte Erkrankungen wie z. B. alpha-1-Antitrypsinmangel, zystische Fibrose, Adenosindesaminasemangel und maligner Tumoren wie z. B. Melanome, Mammatumore und Intestinalkarzinome.

Bislang sind jedoch keine Vektoren bekannt, die sowohl eine räumliche als auch zeitliche Steuerung der Freisetzung von Nukleinsäuren ermöglichen.

Es besteht daher für vielfältige Zwecke weiterhin ein Bedarf an gezielt applizierbaren Formulierungen, die die genannten Nachteile des Standes der Technik überwinden, d.h. bei denen sowohl der Ort und Zeitpunkt der Wirkstofffreisetzung als auch die Menge der abgegebenen Substanz, gezielt durch einfache, nicht invasive Maßnahmen gesteuert werden kann. Die Formulierungen sollten darüber hinaus eine hohe Stabilität, insbesondere in Hinblick auf mechanische Einflüsse, aufweisen.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, derartige Formulierungen zur Verfügung zu stellen, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung zu schaffen.

Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

5

Es wurde gefunden, daß bei mikropartikulären Systemen, die zusammengesetzt sind aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln, die aus einer bioabbaubaren Hülle und einem gas- und wirkstoffhaltigen Kern bestehen, überraschenderweise bei der Bestrahlung mit diagnostischen Ultraschallwellen in einem Frequenzbereich der unterhalb der Resonanzfrequenz der Partikel liegt, die Hülle dieser Partikel zerstört wird und so der (die) verkapselte(n) Wirkstoff(e) gezielt freigesetzt wird (werden).

10

Die Erfindung betrifft somit neue wirkstoffhaltige Mikropartikel, die neben dem Wirkstoff ein Gas, eine gasförmige Phase oder Gasgemische enthalten, sowie mikropartikuläre Systeme bestehend aus den erfindungsgemäßen Mikropartikeln sowie einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium.

15

Die Partikel weisen eine Dichte kleiner als $0,8 \text{ g/cm}^3$, bevorzugt kleiner als $0,6 \text{ g/cm}^3$ auf und haben eine Größe im Bereich von $0,1 - 8 \text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise $0,3 - 7 \text{ }\mu\text{m}$. Im Falle von verkapselten Zellen beträgt die bevorzugte Partikelgröße $5-10 \text{ }\mu\text{m}$. Aufgrund der geringen Größe verteilen sie sich nach i.v. Injektion innerhalb des gesamten Gefäßsystems. Unter Sichtkontrolle auf dem Monitor eines diagnostischen Ultraschallgerätes kann dann durch Intensivierung des Schallsignals eine vom Anwender gesteuerte Freisetzung der enthaltenen Stoffe herbeigeführt werden, wobei die zur Freisetzung erforderliche Frequenz unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikropartikel liegt. Geeignete Frequenzen liegen im Bereich von $1 - 6 \text{ MHz}$, bevorzugt zwischen $1,5$ und 5 MHz .

25

Dadurch ist erstmalig innerhalb des gesamten Körpers eine kombinierte Steuerung der Wirkstofffreigaberate und des Wirkstofffreigabeortes durch den Anwender möglich. Diese Freisetzung, durch Zerstörung der Partikelhülle, ist überraschenderweise auch mit Ultraschallfrequenzen weit unterhalb der Resonanzfrequenz der Mikrobläschen mit in der medizinischen Diagnostik üblichen Schalldrücken möglich, ohne daß es zu einer Erwärmung des Gewebes kommt. Dieses ist besonderes deswegen bemerkenswert, weil auf Grund der großen mechanischen Stabilität der Partikelhülle - wie sie z.B. in Hinblick auf Lagerstabilität von Vorteil ist - eine Zerstörung der Hülle mit relativ energiearmer Strahlung nicht zu erwarten war.

30

35

Die Wirkstofffreigabe kann aufgrund des hohen Gasanteils der Partikel und der damit verbundenen Echogenität, *in vivo* über die Abnahme des empfangenen Ultraschallsignals kontrolliert werden.

5

Weiterhin wurde gefunden, daß bei Anwendung erfindungsgemäßer mikropartikulärer Systeme ein verbesserter Transfer von Wirkstoffen in die Zellen erzielt werden kann (Sonoporation).

- 10 Außerdem wurde gefunden, daß die aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen freigesetzten Wirkstoffe im Vergleich zu dem reinen Wirkstoff überraschenderweise eine erhöhte pharmakologische Wirksamkeit zeigen.

- 15 Die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme sind aufgrund ihrer Eigenschaften für eine gezielte Freisetzung von Wirkstoffen und deren erhöhten Transfer in die Zielzellen unter Einwirkung von diagnostischem Ultraschall geeignet.

- Als Hüllmaterialien für die Gas/Wirkstoff enthaltenden Mikropartikel eignen sich prinzipiell alle biologisch abbaubaren und physiologisch verträglichen Materialien, wie
- 20 z.B. Proteine wie Albumin, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate wie z.B. succinylierte Gelatine, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol (z.B. mit Polyethylenglykol konjugiertes Albumin), Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin, biologisch abbaubare synthetische Polymere wie Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und
- 25 Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly- ϵ -caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und ϵ -Caprolacton und deren Gemische. Besonders geeignet sind Albumin, Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polycarbonate, Polyaminosäuren, Poly- ϵ -caprolacton sowie Copolymere aus
- 30 Milchsäure und ϵ -Caprolacton.

- Das (die) eingeschlossene(n) Gas(e) können beliebig gewählt werden, wobei jedoch physiologisch unbedenkliche Gase wie Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Edelgase, halogenierte Kohlenwasserstoffe, SF_6 oder deren Gemische bevorzugt sind. Ebenfalls geeignet sind Ammoniak, Kohlendioxid sowie dampfförmige Flüssigkeiten, wie z.B.
- 35 Wasserdampf oder niedrigsiedende Flüssigkeiten (Siedepunkt $< 37^\circ\text{C}$).

Der pharmazeutische Wirkstoff kann ebenfalls beliebig gewählt werden. Als Beispiele seien genannt Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile von bakteriologischen Zellwänden, Peptide wie z.B. Endothelin, Proteine, Glycoproteine, Hormone, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, 5 tromboolytische Agenzien, Tumornekrose Faktoren, Zytokine (wie z.B. Interleukine, koloniestimulierende Faktoren wie GM-CSF, M-CSF, G-CSF) und/oder Prostaglandine. Die erfindungsgemäßen Mikropartikeln eignen sich insbesondere zur Verkapselung von Nukleinsäuren, ganzen Zellen und/oder Zellbestandteilen, die (z.B. bei der Gentherapie) im Zielorgan mittels Ultraschall freigesetzt werden sollen.

10

Der Begriff pharmazeutischer Wirkstoff schließt sowohl die natürlichen, als auch die synthetisch oder gentechnologisch hergestellten Wirkstoffe ein.

Bevorzugt werden pharmazeutische Wirkstoffe verwendet, deren applizierte Dosis (bei 15 bolusförmiger Injektion) 100 mg pro Anwendung nicht übersteigt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei den erfindungsgemäßen mikropartikulären Systemen, wie zuvor beschrieben, eine Erhöhung der pharmakologischen Wirksamkeit erreicht wird, wobei in verschiedenen Fällen eine Wirkungsverstärkung beobachtet werden kann, wodurch die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme auch für Wirkstoffe 20 einsetzbar sind, die auf konventionellem Wege im Bolus höher als 100 mg pro Anwendung dosiert werden müssen.

Sind noch höhere Dosierungen erforderlich, so empfiehlt es sich die Mittel über einen längeren Zeitraum als Infusionslösung zu verabreichen

25

Obgleich es über die genannten Limitierungen hinaus keine weiteren Einschränkungen gibt, können die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme besonders dort mit Vorteil eingesetzt werden, wo es aufgrund einer geringen *in vivo* Lebensdauer des Wirkstoffs in freier Form nicht oder nur in beschränktem Ausmaß möglich ist, das 30 Zielorgan zu erreichen, ohne daß zuvor Zersetzung des Wirkstoffs eingetreten ist. Zu derartigen Wirkstoffen zählen verschiedene Hormone, Peptide, Proteine, Zellen und deren Bestandteile sowie Nukleinsäuren.

Ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel besteht darin, 35 daß zunächst in an sich bekannter Weise (DE 38 03 972, WO 93/00933, EP 0 514 790, WO 92/17213, US 5,147,631, WO 91/12823, EP 0 048 745) gasgefüllte Mikropartikel hergestellt werden. Erfindungsgemäß werden diese dann mit in überkritischen Gasen gelösten Wirkstoffen befüllt. Dazu werden die mit geeigneten

Verfahren getrockneten (z.B. Gefriertrocknung) gashaltigen Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas in einem Autoklaven behandelt. Zweckmäßigerweise verfährt man, indem Wirkstoff und gasgefüllter Mikropartikel gemeinsam in einem Autoklaven vorgelegt werden und dieser anschließend mit dem überkritischen Gas oder Gasgemisch befüllt wird. Als überkritische Gase eignen sich je nach Wirkstoff alle Gase, die in einen überkritischen Zustand überführt werden können, insbesondere jedoch überkritisches Kohlendioxid, überkritischer Stickstoff, überkritischer Ammoniak sowie überkritische Edelgase. Nach der Behandlung der Mikropartikel mit der Lösung des Wirkstoffs im überkritischen Gas oder Gasgemisch wird der überschüssige Wirkstoff an der äußeren Oberfläche der Mikropartikel falls erforderlich durch Waschen der Mikropartikel in einem geeigneten Medium entfernt und die so gereinigten Partikel gewünschtenfalls gefriergetrocknet. Dieses Verfahren ist für alle Wirkstoffe geeignet, die sich in überkritischen Gasen oder Gasgemischen lösen, wie z.B. Peptide oder lipophile Arzneistoffe.

Ein alternatives Verfahren, das sich insbesondere zur Verkapselung von Wirkstoffen die in überkritischen Gasen oder Gasgemischen unlöslich sind (wie z.B. Proteine, zuckerhaltige Verbindungen), eignet, beruht auf der Verkapselung einer wirkstoffhaltigen wäßrigen Phase mittels einer Mehrfachemulsion. Als besonders geeignet haben sich Wasser/Öl/Wasser (W/Ö/W)-Emulsionen erwiesen. Dazu wird das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von 0,01 - 20 % (m/V) gelöst. In diese Lösung wird eine wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert, daß eine Emulsion vom Typ W/O entsteht. Beide Lösungen können zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten. Bevorzugt ist es jedoch, aus Gründen der im allgemeinen begrenzten biologischen Verträglichkeit von Emulgatoren, auf diese weitgehend zu verzichten. Als vorteilhaft hat es sich erwiesen, der inneren wäßrigen Phase pharmazeutisch akzeptable Quasiemulgatoren wie z.B. Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Gelatine, Albumin oder Dextrane im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 25 % zuzusetzen. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, in der inneren wäßrigen Phase, gegebenenfalls zusätzlich zu den anderen verwendeten Hilfsstoffen, 0,1 - 20 % (m/V) eines gut wasserlöslichen pharmazeutisch akzeptablen Salzes oder Zuckers oder Zuckeralkohols, wie z.B. Natriumchlorid, Galaktose, Mannitol, Laktose, Saccharose, Glukose, Natriumhydrogenphosphat zu lösen. Es kann außerdem vorteilhaft sein, die innere wäßrige Phase vor der Emulgierung mit der verwendeten organischen Phase zu sättigen. Die hergestellte Emulsion vom Typ W/O sollte eine mittlere Tröpfchengröße der inneren Phase von ca. 0,1 bis 10 µm aufweisen. Diese Emulsion wird unter Rühren in das mindestens gleiche Volumen einer wäßrigen

- Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gegeben. Das organische Lösungsmittel wird unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt. Die erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel werden erforderlichenfalls gewaschen und anschließend so getrocknet, daß die innere
- 5 Wasserphase ohne Zerstörung der Mikropartikel entfernt wird. Grundsätzlich geeignete Trocknungsverfahren sind die Gefriertrocknung und die Sprühtrocknung. Bevorzugt ist die Gefriertrocknung. Dazu wird in der Suspension der Mikropartikel ein gerüstbildender Hilfsstoff wie z.B. Zucker, Zuckeralkohole, Gelatine, Gelatine-Derivate, Albumin, Aminosäuren, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol in einer
- 10 Konzentration von ca. 0,5 - 20 % (m/V) gelöst. Die Suspension wird anschließend bei möglichst tiefen Temperaturen, bevorzugt unterhalb ca. -30 °C eingefroren und dann gefriergetrocknet. Nach der Gefriertrocknung und Redispersierung in einem geeigneten Suspensionsmedium, lassen sich die entstandenen gashaltigen Mikropartikel der erforderlichen Dichte durch Flotation oder Zentrifugation, von eventuell ebenfalls
- 15 vorhandenen soliden oder immer noch wassergefüllten Mikropartikeln abtrennen und falls erforderlich, möglichst unter Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefriergetrocknen. Die Mikropartikel enthalten dann den verkapselten Wirkstoff und Gas bzw. gasförmige Phase nebeneinander.
- 20 Die Herstellung der erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme aus den nach den vorbeschriebenen Verfahren hergestellten Partikel erfolgt durch Resuspendieren der Partikel in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium. Das Resuspendieren in einem geeigneten Medium kann sich unmittelbar an den letzten
- 25 Verfahrensschritt (die Gefriertrocknung) anschließen, kann aber gewünschtenfalls auch erst durch den behandelnden Arzt vor der Anwendung erfolgen.
- In letzterem Fall liegen die erfindungsgemäßen mikropartikulären Systeme als ein Kit, bestehend aus einem ersten die Partikel enthaltenden Behälter und einem zweiten das Suspensionsmedium enthaltenden Behälter, vor. Die Größe des ersten Behälters ist so zu wählen, daß auch das Suspensionsmedium in diesem vollständig Platz findet. So
- 30 kann z.B. mittels einer Spritze über eine im Verschluß des ersten Behälters befindliche Membran, das Suspensionsmedium vollständig zu den Partikeln gegeben werden und durch anschließendes Schütteln die injektionsfertige Suspension hergestellt werden. Als Suspensionsmedien kommen alle dem Fachmann bekannten injizierbaren Medien infrage, wie z.B. physiologische Kochsalzlösung, Wasser p.i. oder 5%ige Glukoselösung.
- 35

Die applizierte Menge richtet sich nach dem jeweilig eingeschlossenen Wirkstoff. Als orientierender oberer Grenzwert kann ein Wert angenommen werden, wie er auch bei

konventioneller Verabreichung des jeweiligen Wirkstoffs verwendet werden würde. Aufgrund des wirkungsverstärkenden Effekts sowie der Möglichkeit den Wirkstoff spezifisch aus den erfindungsgemäßen mikropartikulären System freizusetzen, liegt die erforderliche Dosis im allgemeinen jedoch unter diesem oberen Grenzwert.

5

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung des Erfindungsgegenstandes, ohne ihn auf diese beschränken zu wollen.

Beispiel 1: Coffein-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylat

Gasgefüllte Mikropartikel, die aus Butylcyanacrylsäure gemäß DE 38 03 972 hergestellt wurden, werden unter Zusatz von 2 % (m/V) Polyvinylalkohol
5 gefriergetrocknet. Es werden ca. $3 \cdot 10^9$ Partikel in Form des Lyophilisats zusammen mit 50 mg Coffein in einen Autoklaven gefüllt. Das Gemisch wird bei ca. 45 °C und 100-120 bar mit Kohlendioxid behandelt. Die Entfernung des überschüssigen Coffeins wird folgendermaßen durchgeführt: Die dem Autoklaven entnommenen Mikropartikel werden in 3 ml Wasser, das 1 % Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die
10 Partikel werden durch Zentrifugation abgetrennt und in 3 ml Wasser, das 1 % Lutrol F 127 gelöst enthält, resuspendiert. Die Zentrifugation mit anschließender Redispersierung in 3 ml Wasser, das 1 % Lutrol F 127 gelöst enthält, wird solange wiederholt, bis im Wasser kein Coffein mehr photometrisch bei 273 nm nachgewiesen werden kann.

15

Beispiel 2: Fibrinolytische Mikropartikel aus Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

2 g Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50:50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingel-
20 heim) werden in 20 ml CH_2Cl_2 gelöst. 10 mg r t-PA (Gewebsplasminogenaktivator) werden in 4 ml einer 4 %igen wässrigen Gelatinelösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 4 %igen autoklavierten Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird
25 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4 %iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei -78 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für
30 Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm³ auf.

Beispiel 3: in vitro Freisetzung von Coffein durch Ultraschall

35 1 ml einer nach Beispiel 1 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von 10^8 Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des

- B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer mittleren Schalleistung (Transmit ≤ 20 dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine Prüfung des partikelfreien Wassers auf Coffein bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit > 30 dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun
- 5 nachweisbares freies Coffein, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte.

- Beispiel 4: in vitro Freisetzung von rekombinantem tissue Plasminogen Aktivator (r t-PA) durch Ultraschall
- 10

- 1 ml einer nach Beispiel 2 zubereiteten Partikelsuspension, mit Wasser verdünnt auf eine Konzentration von 10^8 Partikel/ml wird in ein mit 100 ml entgastem Wasser gefülltes Becherglas gegeben. In das Wasser wird ein 3,5 MHz Schallkopf eines
- 15 diagnostischen Ultraschallgerätes (HP Sonos 1000) getaucht und die Veränderung des B-Bildes beobachtet. Zunächst wird das Gerät mit einer geringen Schalleistung (Transmit ~ 10 dB) betrieben, wobei deutliche Echos zu erkennen sind. Eine Prüfung des partikelfreien Wassers auf r t-PA bleibt negativ. Wird der Schalldruck erhöht (Transmit > 30 dB), verschwinden die Echos. Die Flüssigkeit enthält nun
- 20 nachweisbares freies r t-PA, mikroskopisch sind überwiegend Bruchstücke der Mikropartikel zu erkennen und nur noch sehr wenige intakte. Die mit dem erhöhten Schalldruck behandelte Partikelsuspension weist fibrinolytische Eigenschaften auf.

- 25 Beispiel 5: Mitomycin-haltige Mikropartikel aus Polymilchsäure

- 2 g Polymilchsäure (MG ca. 20 000) werden in 100 ml CH_2Cl_2 gelöst. 20 mg Mitomycin werden in 15 ml 0,9 %iger wässriger Kochsalzlösung gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach
- 30 vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 1 %igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG ca. 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen $5\ \mu\text{m}$ -Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5 %igen Lösung von Polyvinylpyrrolidon (MG ca. 10 000) in Wasser resuspendiert, bei -50°C eingefroren
- 35 und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als $0,7\ \text{g/cm}^3$ auf. Sie eignen sich auch

als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Mitomycin frei.

Beispiel 6: Vincristinsulfat-haltige Mikropartikel aus Poly-ε-caprolacton

5

2 g Poly-ε-caprolacton (MG ca. 40 000) werden in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst. 10 mg Vincristinsulfat werden in 15 ml einer 5 %igen wässrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 5 %igen Lösung von Humanalbumin in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 5 %igen Lösung von Humanalbumin in Wasser resuspendiert, bei -50 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm³ auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Vincristinsulfat frei.

20

Beispiel 7: Ilomedin-haltige Mikropartikel aus Polycyanacrylsäurebutylester

3 g Polycyanacrylsäurebutylester werden in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst. 1 mg Ilomedin wird in 15 ml einer 5 %igen wässrigen Lösung von Galactose gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 2,5 %igen Lösung von Polyvinylalkohol (MG 15 000) in Wasser unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 µm-Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml einer 10 %igen Lösung von Lactose in Wasser resuspendiert, bei -50 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel weisen eine Dichte kleiner als 0,7 g/cm³ auf. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschall und setzen bei Beschallung mit diagnostischem Ultraschall Ilomedin frei.

35

Beispiel 8: Methylenblau-haltige Mikropartikel aus Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

4 g Poly (D,L-Milchsäure-Glykolsäure) (50:50) (Resomer RG 503, Boehringer Ingelheim) werden in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst. 20 mg Methylenblau werden in 4 ml einer 4 %igen wässrigen Gelatinelösung, die zuvor autoklaviert wurde, gelöst und unter Rühren mit einem schnellaufenden Rührwerk zu der organischen Phase gegeben. Nach vollständiger Emulgierung werden 200 ml einer 4 %igen autoklavierten Gelatinelösung unter weiterem Rühren zugegeben. Die Emulsion wird 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandenen Partikel werden durch einen 5 μm -Filter filtriert, durch Zentrifugation separiert, in 50 ml 4 %iger autoklavierter Gelatinelösung resuspendiert, bei -78°C eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung werden die gashaltigen Mikropartikel durch Zentrifugation (bei 1000 Upm, 30 min) abgetrennt. Die gashaltigen Mikropartikel werden in 20 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie weisen eine Dichte kleiner als $0,7 \text{ g/cm}^3$ auf und setzen bei Beschallung mit Ultraschall (Schalldruck $> 50\text{dB}$, Frequenz $2,5\text{MHz}$) Methylenblau frei.

Beispiel 9: Nukleinsäurehaltige Mikropartikel (Markergen β -Gal + Albuminpromotor) aus Poly(D,L-Milchsäure-Glykolsäure)

0,4 g Polyvinylpyrrolidon ($k < 18$) und 2 g eines Copolymeren aus Milchsäure und Glykolsäure 50:50 werden in 50 ml CH_2Cl_2 gelöst. Unter Rühren werden 5 ml einer Lösung von 300 μg Markergen β -Gal mit Albuminpromotor in 0,9 %iger Kochsalzlösung zugegeben. Die entstandene Emulsion wird unter Rühren in 200 ml einer 2 %igen autoklavierten (121°C , 20 min) Gelatinelösung überführt. Nach 3 h wird die entstandene Suspension in Portionen à 5 ml abgefüllt, bei -55°C eingefroren und anschließend 70 h gefriergetrocknet. Die Vials werden nach Gefriertrocknung mit je 5 ml Wasser resuspendiert und 3 h stehen gelassen. Die flotierten Partikel werden abgenommen in je 2 ml Wasser, das 10 % PVP enthält, resuspendiert und nach Einfrieren bei -55°C erneut 90 h gefriergetrocknet.

Beispiel 10: In-vitro-Freisetzung von Nukleinsäure (Markergen β -Gal + Albuminpromotor) aus Mikropartikeln

- 1 Vial einer nukleinsäurehaltigen Mikropartikelpräparation, hergestellt nach
5 Beispiel 9, wird mit 2 ml Wasser resuspendiert. 1 ml der Suspension wird mit
Ultraschall behandelt (Probe 1), 1 ml wird nicht mit Ultraschall behandelt (Probe 2).
Beide Proben werden zentrifugiert, die partikelarmen Phasen entnommen, durch einen
0,2 μ m Filter filtriert. Die Filtrate werden mittels Gelelektrophorese auf ihren Gehalt
an Markergen β -Gal untersucht. Das Filtrat aus Probe 1 enthält ca. 100 % mehr β -Gal
10 als das Filtrat aus Probe 2.

Beispiel 11: In-vivo-Freisetzung von Nukleinsäure (Markergen β -Gal + Albuminpromotor) aus Mikropartikeln

- 15 2 Vials einer nukleinsäurehaltigen Mikropartikelpräparation, hergestellt nach Beispiel
9 werden mit je 2 ml Wasser resuspendiert. Das gesamte Resuspendat wird der
narkotisierten Ratte langsam i. v. (ca. 0,5 ml/min) appliziert. Während der
Applikation erfolgt eine Beschallung (7,5 MHz) der Leber, welche bis zu 20 min nach
20 Injektionsabschluß fortgeführt wird. 48 Stunden nach der Partikelgabe wird die Leber
entnommen und bei -40 °C in Isopentan schockgefroren. Der enzymhistochemische
Nachweis der neutralen β -Galaktosidase erfolgt an 8 - 10 μ m dicken Gefrierschnitten.
Die Gegenfärbung wird mit Kernechtrot durchgeführt. Im Lebergefrierschnitt stellte
sich die neutrale β -Galaktosidase - als Ergebnis der Genexpression - diffus verteilt als
25 dunkelblaue Signale dar.

Patentansprüche

1. Wirkstoffhaltige Mikropartikel, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel neben dem Wirkstoff auch eine gasförmige Phase enthalten.
- 5 2. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dichte der Partikel kleiner als 0,8 g/cm³ ist.
3. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgröße 0,1 - 10 µm ist.
- 10 4. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelhülle aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymeren aufgebaut ist.
- 15 5. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch abbaubares Polymer Proteine, Gelatine, Fibrinogen, Collagen sowie deren Derivate, quervernetzte Polypeptide, Umsetzungsprodukte von Proteinen mit Polyethylenglykol, Stärke oder Stärkederivate, Chitin, Chitosan, Pektin, Polymilchsäure, Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure, Polycyanoacrylate, Polyester, Polyamide, Polycarbonate, Polyphosphazene, Polyaminosäuren, Poly-ε-caprolacton sowie Copolymere aus Milchsäure und ε-Caprolacton oder deren Gemische verwendet wird.
- 20 6. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Arzneistoffe, Toxine, Viren, Virusbestandteile, Bestandteile von bakteriologischen Zellwänden, lösliche Botenstoffe, Farbstoffe, Komplement Komponenten, Adjuvantien, trombolytische Agentien, Tumornekrose Faktoren, Nukleinsäuren, Peptide, Proteine, Glykoproteine, Hormone, Zytokine und/oder Prostaglandine enthalten ist.
- 25 7. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Zellen und/oder deren Bestandteile enthalten sind.
- 30 8. Wirkstoffhaltige Mikropartikel nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß als gasförmige Phase Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid, Edelgase, Ammoniak, halogenierte oder teilhalogenierte Kohlenwasserstoffe, SF₆ und/oder Wasserdampf oder niedrigsiedende Flüssigkeiten (Sdp. < 37 °C) enthalten sind.

9. Mikropartikuläre Systeme bestehend aus einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium und Mikropartikeln nach Anspruch 1-8.
- 5 10. Mikropartikuläre Systeme nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenen Partikel durch Einstrahlung von diagnostischem Ultraschall unter Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffs zerstört werden können.
11. Verfahren zur gezielten *in vivo* Wirkstofffreisetzung aus mikropartikulären Systemen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltenen
10 Partikel nach der Applikation mit diagnostischem Ultraschall bestrahlt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Frequenz des diagnostischen Ultraschalls 1 - 6 bevorzugt 1,5 - 5 MHz beträgt.
- 15 13. Verfahren zur Erhöhung des Transfers von Wirkstoffen in die Zielzellen, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff aus einem mikropartikulären Systemen mittels Ultraschall freigesetzt wird.
- 20 14. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß gashaltige Mikropartikel mit einer Lösung des Wirkstoffs in einem überkritischen Gas, bevorzugt in überkritischem Kohlendioxid, überkritischem Stickstoff, überkritischem Ammoniak sowie überkritischen Edelgasen, in einem Autoklaven behandelt, anschließend gewünschtenfalls gewaschen
25 und gefriergetrocknet werden.
15. Verfahren zur Herstellung von wirkstoffhaltigen Mikropartikeln nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hüllmaterial in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, das nicht in Wasser löslich ist, in einer Konzentration von 0,01 -
30 20 % (m/V) gelöst wird und in diese Lösung eine wäßrige Lösung des zu verkapselnden Wirkstoffs so emulgiert wird, daß eine Wasser in Öl Emulsion mit einer mittleren Teilchengröße der inneren Phase von ca. 0,1 bis 10 µm entsteht, wobei beide Lösungen gegebenenfalls zusätzlich Hilfsstoffe wie Emulgatoren enthalten können und man anschließend diese Emulsion unter Rühren in das mindestens
35 gleiche Volumen einer wäßrigen Lösung eines Emulgators oder Quasiemulgators gibt, das organische Lösungsmittel unter Rühren durch geeignete Verfahren (solvent evaporation) wieder entfernt, die so erhaltenen wassergefüllten Mikropartikel falls gewünscht zunächst wäscht und anschließend, falls gewünscht

unter Zugabe von gerüstbildenden Hilfstoffen gefrier- bzw. sprühtrocknet und falls gewünscht in einem geeigneten Suspensionsmedium redispergiert und die Mikropartikel mit einer Dichte kleiner als $0,8 \text{ g/cm}^3$ durch Flotation oder Zentrifugation abtrennt und falls erforderlich, gewünschtenfalls unter erneutem Zusatz von Gerüstbildnern, erneut gefriertrocknet.

16. Verfahren zur Herstellung von mikrodispersen Systemen, dadurch gekennzeichnet, daß Mikropartikel nach Anspruch 1 in einem pharmazeutisch verträglichen Suspensionsmedium suspendiert werden.
17. Ein Kit bestehend aus einem ersten Behälter enthaltend die wirkstoff- und gashaltigen Mikropartikel nach Anspruch 1 und einem zweiten Behälter enthaltend eine pharmazeutisch verträgliche Trägerflüssigkeit, die nach Mischen mit dem Inhalt des ersten Behälters eine fließfähige injizierbare Suspension ergibt, wobei
- a) das Volumen des ersten Behälters so gewählt ist, daß zusätzlich zu den Partikeln auch die Trägerflüssigkeit vollständig Platz darin findet und b) beide Behälter jeweils eine Dosis einheitsmenge an wirkstoffhaltigen Mikropartikeln bzw. Trägerflüssigkeit enthalten.

Patent claims

1. Micro particles of active substance characterized by that the particles, in addition to the active substance, also have a gaseous phase.
2. Micro particles of active substance after claim 1; characterized by that the density of the particles is less than 0.8 g/cm.³
3. Micro particles of active substance after claim 1 and 2; characterized by the particle size of 0.1-10 µg.
4. Micro particles of active substance after claims 1-3; characterized by that the shell (or covering) of particle is composed of at least one biologically degradable polymer.
5. Micro particles of active substance after claims 1-4, characterized by that as biologically degradable polymer the following are being used: proteins, gelatins, fibrin, collages (?) as well as their derivatives, cross-linked (cross-integrated) polypeptides, conversion (transformation/reaction) products of proteins with polyethyleneglycols (?), acids or acid derivatives, chitin, chitosan, pectin, polylactic acid, copolymer from lactic acid and glycolic acid, polycyanoacrylate, polyester, polyamide, polycarbonate, polyphosphazene, polyamino acids, poly-ε-caprolacton as well as copolymer from lactic acid and ε-caprolacton or their mixtures (compositions).
6. Micro particles of active substance after claims 1-5, which are characterized by including as active substances medicinal (pharmaceutical) substances, toxins, viruses, virus components, components of bacteriological cell walls, soluble messenger substances (?), (color-) dyes, complement components, adjuvants, trombolytic agents (?), tumornecrotic factors, nucleic acids, peptides, proteins, glycoproteins, hormones, zytocine (cytokine ?) and/or prostaglandin.
7. Micro particles of active substance after claims 1-6, which are characterized by having as an active substance cells and/or their components.
8. Micro particles of active substance after claims 1-7, which are characterized by inclusion of gaseous phase as air, nitrogen, oxygen, carbon dioxide, inert (rare) gases, ammonia, halide (halogen) or partially halide hydrocarbons, SF 6 and/or water vapor (steam) or low-boiling

liquids (boiling point < 37 degrees C).

9. Microparticulate systems which are composed of a pharmaceutically compatible dispersing agent (suspension medium) and micro particles after claims 1-8.
10. Microparticulate systems after claim 9, which are characterized by that their included particles can be destroyed by absorbed radiation of diagnostic ultrasound upon release of the included substance.
11. Process of the precisely aimed *in vivo* substance release out of microparticulate systems after claim 9, characterized by their inclusive particles being irradiated (illuminated) with diagnostic ultrasound after the application.
12. Process after claim 11; characterized by the frequency of the diagnostic ultrasound being 1-6, preferably 1.5-5 MHz.
13. Process to elevate the transfer of substances into the target cells; characterized by that the substance is being released via ultrasound from a microparticulate system.
14. Process to produce active substance micro particles after claim 1; characterized by gaseous micro particles being treated in a autoclave-with a solution of the substance in a hypercritical gas (preferably in hypercritical carbon dioxide, hypercritical nitrogen, hypercritical ammonia, as well as hypercritical rare gases), optional to be washed & freeze-dried afterward.
15. Process to the production of micro particles containing active substances after claim 1; characterized by that the shell (outer) material is being dissolved in an appropriate solvent of a concentration of 0.01-20% (m/V). The solvent ought not be water-soluble! Into this solvent, a watery solvent of the substance which is to be encapsulated in such a manner that a water in oil emulsion of a medium-size particle size (ca. 0.1-10 μ g) of the inner phase will occur - in which process both solvents possibly could contain, in addition, auxiliary material such as emulators. In this case, one could then, while stirring, add this emulsion into at least the same volume of a watery solution of an emulgator or quasi-emulgator/emulator (?), which again will remove the organic solvent, under stirring, in the appropriate process (solvent evaporation). The water-filled micro particles produced in such a way, may - if one chooses to- first be washed and then -if one chooses to- freeze-dried or spray-dried by adding structure-building solvents. If one chooses to, the micro particles then may be re-

dispersed into an appropriate dispersing agent and those micro particles whose density is less than 0.8 g/cm may be separated by flotation or centrifugation and, if necessary, one may then, again, freeze-dry them by adding structure-builders.

16. Process to produce micro disperse systems; characterized by that the micro particles after claim 1 are being suspended in a pharmaceutically compatible dispersing agent.
17. A Kit that consists of one container (receptacle) which contains the active substance- micro particles and gaseous micro particles after claim 1, as well as another container which contains a pharmaceutically compatible carrier liquid, which after mixing with the content of the first container results in a fluid, injectable suspension, in which a) the volume of the first container is chosen so that , in addition to the particles, the carrier liquid also has sufficient room within it and b) both containers contain each a uniform dose amount of active substance- micro particles, or carrier liquid.